

Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН

PONTUS EUXINUS
ПОНТ ЭВКСИНСКИЙ : XI



ПОНТ ЭВКСИНСКИЙ – 2019

XI Всероссийская научно-практическая конференция для молодых
учёных по проблемам водных экосистем,

посвященная памяти д.б.н., проф. С. Б. Гулина

Материалы конференции

Севастополь, 23–27 сентября 2019 г.

Севастополь
ФИЦ ИнБЮМ

2019

3. Практическая гидробиология. Пресноводные экосистемы : учебник для студентов, обучающихся по направлению 020200 «Биология», специальности «Биоэкология» и другим биологическим специальностям / под ред. В. Д. Федорова, В. И. Капкова. Москва : [ПИМ], 2006. 367с.

РЕГУЛЯТОРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ОБЪЕМА И ОСМОТИЧЕСКАЯ СТОЙКОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ КАРАСЯ (*CARASSIUS CARASSIUS*) В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ И МЕТГЕМОГЛОБИНЕМИИ

Андреева А.Ю.^{1,2}

¹Институт морских биологических исследований им. А. О. Ковалевского РАН

²Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН

Ключевые слова: эритроциты, гемоглобин, осмотическая стойкость, регуляторное снижение объема

Одной из ключевых функций живых клеток является поддержание осмотического равновесия с окружающей средой. В условиях снижения осмолярности среды происходит немедленное набухание клеток для выравнивания осмотического давления между цитоплазмой и внеклеточной жидкостью. После фазы набухания объем эритроцитов большинства представителей позвоночных, за исключением млекопитающих начинает снижаться за счет активации токов ионов через специфические каналы клеточной мембраны. Подобная реакция получила название регуляторного снижения объема (RVD) [1, 2]. Показано, что характер протекания RVD в эритроцитах низших позвоночных зависит от наличия кислорода в среде. Механизм, лежащий в основе кислород-зависимой регуляции активности ионных каналов мембраны эритроцитов, в настоящее время не установлен. У высших позвоночных, современная концепция влияния кислорода на внутриклеточные процессы в эритроцитах предполагает, что роль регулятора и передатчика сигнала на системы мембранного транспорта может играть мембрано-связанный гемоглобин (Hb) [3].

В настоящей работе мы исследовали зависимость реакции RVD и показателя осмотической стойкости эритроцитов золотого карася, *Carassius carassius*, от конформационного состояния гемоглобина.

В работе использовались взрослые особи золотого карася, *Carassius carassius*, (n=12) обоих полов. Кровь отбирали из хвостовой вены гепаринизированным шприцем и разбавляли средой состава (в mM): NaCl, 128; KCl, 3; CaCl₂, 1.5; MgCl₂, 1.5; HEPES, 15; D-глюкоза, 2.2 (pH=7.8, осмолярность 260 мОсм л⁻¹), и проводили трехкратную отмывку центрифугированием (центрифуга CM-50, Elmi, Латвия; 500 g, 5 мин). Осмотическую стойкость эритроцитов определяли путем серии разбавлений суспензии в диапазоне осмолярности с 260 до 45 мОсм л⁻¹. Осмолярность среды контролировали на криоскопическом осмометре Osmomat 030 (Gonotec, Germany). Для индукции реакции RVD в эритроцитах, осмолярность среды снижали с 260 до 113 мОсм л⁻¹ путем добавления дистиллированной воды к суспензии клеток. Изменения объема эритроцитов записывали в течение 125 мин. Деоксигенацию гемоглобина индуцировали путем барботажа буферного раствора аргоновым газом (100% Ar₂) до момента внесения клеток. Реоксигенация гемоглобина кислородом в эритроцитах, инкубированных в гипоксии в течение 55 мин, проводили в естественных условиях нахождения суспензии кислородом воздуха. Содержание кислорода контролировали с помощью кислородного датчика mini-Oxsik 3 («Аналитика-Сервис») в гипоксической камере (Billups Rothenberg), спектры Hb контролировали в диапазоне сканирования 300-700 нм.

Метгемоглобинемию индуцировали путем инкубации клеток с трет-бутиловым спиртом (1 мМ, 5 мин). Для регистрации изменений объема эритроцитов и процента гемолиза клеток использовали метод лазерной дифракции. Осмотическую резистентность эритроцитов оценивали путем расчета показателя лизиса 50 % эритроцитов в суспензии - Osm50.

В оксигенированных эритроцитах концентрация оксигемоглобина составляла 96.4 ± 3.7 % от общего Нб, доля метгемоглобина не превышала 1 %. Инкубация клеток в гипоксической среде приводила к переходу большей части Нб в деоксигенированную форму (96.5 ± 2.7 %) без изменений в количестве метгемоглобина. Естественная реоксигенация гипоксических клеток восстановила количество оксигемоглобина до значений нормоксии. Инкубация клеток с третбутилом привела к быстрому окислению Нб до метгемоглобина (48.4 ± 1.8 %) с образованием деоксигемоглобина (41.3 ± 2.3 %). У оксигенированных клеток величина Osm50 (69.0 ± 3.2 мОсм л⁻¹) была более чем в 3 раза ниже, чем осмолярность плазмы крови (268 ± 4.5 мОсм л⁻¹). Деоксигенация гемоглобина и последующий цикл реоксигенации не оказывали влияния на осмотическую стойкость эритроцитов. Индуцированная метгемоглобинемия, в свою очередь, достоверно снижала стабильность мембран эритроцитов - величина Osm₅₀ составила 111.6 ± 1.6 мОсм л⁻¹.

Снижение осмолярности среды с 260 мОсм л⁻¹ (физиологическая осмолярность) до 113 мОсм л⁻¹ (гипоосмотический шок) инициировало увеличение объема оксигенированных эритроцитов *C. carassius* на 29 %. Спустя 5 мин инкубации клетки начинали восстанавливать свой исходный объем, осуществляя компенсаторное снижение объема, RVD (<1% различий), которое завершилось в течение 125 мин. У деоксигенированных клеток снижение осмолярности среды вызвало набухание, аналогично эритроцитам, находящимся в условиях нормоксии. Однако дальнейшего изменения объема не происходило. В течение экспериментального периода объем эритроцитов оставался увеличенным, клетки не проявляли реакцию RVD. Естественное насыщение Нб кислородом (реоксигенация) инициировало процесс восстановления объема эритроцитов *C. carassius*. При этом динамика реакции RVD у реоксигенированных клеток была аналогичной эритроцитам, находящимся в условиях нормоксии. У окисленных клеток гипоосмотическая стимуляция вызывала достоверно меньшее увеличение объема. Реакция RVD у клеток с высоким содержанием метгемоглобина отсутствовала в течение всего экспериментального периода.

Работа выполнена в рамках выполнения государственного задания ФГБУН ИМБИ (тема № 0828-2018-0003) и государственного задания ФГБУН ИЭФБ (тема № АААА-А18-118012290371-3).

Список литературы

1. Cossins A. R., Gibson J. S. Volume-sensitive transport systems and volume homeostasis in vertebrate red blood cells // Journal of Experimental Biology. 1997. Vol. 200, iss. 2. P. 343–352.
2. Stutzin A., Hoffmann E. K. Swelling-activated ion channels: functional regulation in cell-swelling, proliferation and apoptosis // Acta Physiologica. 2006. Vol. 187, iss. 1–2. P. 27–42. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2006.01537.x>
3. Chu H., Breite A., Ciraol P., Franco R. S., Low P. S. Characterization of the deoxyhemoglobin binding site on human erythrocyte band 3: implications for O₂ regulation of erythrocyte properties // Blood. 2008. Vol. 111, iss. 2. P. 932–938. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-100180>